

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

特公昭 4 9 - 4 4 3 5 0

(17)

PN=JP 74044350

DIALOG(R)File 352:DERWENT WPI

(c) 2000 DERWENT INFO LTD. All rts. reserv.

001214207

WPI Acc No: 74-88112V/197451

Highly selective 5'-inosinic acid prodn. - by cultivation of

Corynebacterium on phosphate-and inosine-contg. medium

Patent Assignee: AJINOMOTO KK (AJIN); KIKKOMAN SHOYU CO LTD
(KIKK)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Main IPC	Week
JP 74044350	B	19741127					197451 B

Priority Applications (No Type Date): JP 6738190 A 19670616

Abstract (Basic): JP 74044350 B

5'-inosinic acid is produced by cultivating a micro-organism belonging to the genus Corynebacterium in a culture medium contg. inosine and an inorg. salt of phosphoric acid, accumulating 5'-inosinic acid in the fermenting broth and recovering it from the broth. Pref. phosphates are, e.g. potassium (di)hydrogen phosphate, ammonium phosphate, sodium phosphate, calcium phosphate and magnesium phosphate. The 2'- and 3'- acids are not formed.

Derwent Class: B02; D16

International Patent Class (Additional): C07D-051/54; C12D-013/06

17

⑤ Int. Cl.

⑥ 日本分類

⑦ 日本国特許庁

⑧ 特許出願公告

C 12 d 13/06
C 07 d 51/54

36 (2) D 531.42
16 E 611.2

特 許 公 報

昭49-44350

⑨ 公告 昭和 49 年(1974) 11月 27 日

発明の数 1

(全 4 頁)

1

⑩ 微生物による 5'-イノシン酸の製造法

⑪ 特 願 昭 42-38190

⑫ 出 願 昭 42(1967)6月16日

⑬ 発 明 者 山野井昭雄

東京都杉並区成宗1の113

同 城 照雄

茅が崎市小和田4741

同 角田俊道

返子市返子1の7の17

⑭ 出 願 人 味の素株式会社

東京都中央区京橋1の6

同 キツコマン醤油株式会社

野田市野田339

⑮ 代 理 人 弁理士 野本慶造

発明の詳細な説明

この発明は微生物を用いてイノシンをリン酸化して 5'-イノシン酸を製造する方法に関する。

近年 5'-イノシン酸、5'-グアニル酸等の 5'-プリンヌクレオチド類が調味料として広く用いられるに至り、その製造法に関する研究も多数行われている。そのうち、化学的又は生化学的方法により製造されたイノシンを、微生物の作用によりリン酸化して 5'-イノシン酸を生成させる方法については、二、三の報告がある。例えばイノシンを磷酸受容体とし、パラニトロフェニルリン酸を磷酸供与体とする方法(特公昭39-29858)、シユードモナス・オパリス、バチルス・ズブチリスを用い、磷酸供与体として無機磷酸塩を用いる方法(特公昭42-1186)等である。

本発明者等は、イノシンをリン酸化して 5'-イノシン酸に生合成する能力を有する微生物を広く保存菌株、自然界からスクリーニング等で探索したところ、自然界から分離したコリネバクテリウム(Corynebacterium)属細菌が無機磷酸塩の高濃度存在下で極めて高収率にイノシンから 5'-イ

2

ノシン酸を生産することを見出し、この知見に基づいて本発明を完成した。

本発明による 5'-イノシン酸の製造法は、次の如き有利な特徴を有する。

- 5 (1) 合成法、醗酵法、抽出法等によつて安価に入手し得るイノシンを主原料とし得ること。特に醗酵法でイノシンを生産させた場合、培養液からイノシンを採取することなく、培養液そのままの状態で使用出来ること。
- 10 (2) 磷酸供与体として安価な無機磷酸塩を使用出来ること。
- (3) 化学的方法によるリン酸化と異なり、一段階で 5'-イノシン酸が得られること。これらの細菌を用いると 2'-、又は 3'-のイノシン酸は全く生成せず、5'-イノシン酸のみ特異的に著量に生成蓄積させることが出来ること。
- (4) 5'-イノシン酸以外の副生物が認められず、培養液からの 5'-イノシン酸の採取が容易であること。

- 20 (5) あらかじめ適当な条件で培養したコリネバクテリウム属に属し、イノシンと無機磷酸塩より 5'-イノシン酸を生産する能力を有する細菌の菌体を採取し、洗滌菌体、乾燥菌体を得、これを酵素源としてイノシン及び磷酸源と共に反応系に加えて反応させてもよいが、該細菌を増殖させながらイノシンをリン酸化して、5'-イノシン酸に合成させることができること等である。
- 本発明に於いて使用する微生物は、コリネバクテリウム属に属し、イノシンと無機磷酸塩より 5'-イノシン酸を生産する能力を有する細菌であり、例えばコリネバクテリウム・エスピー-AJ-1562(工発研菌寄第47号)がある。コリネバクテリウム・AJ-1562は自然界からのスクリーニングによつて得られたもので、その菌学的諸性質は以下に記載する通りである。

コリネバクテリウム・エスピー・AJ-1562
細胞形態：多形態をとる桿菌、平均の大きさは

3

4

0.5~0.8×1.0~3.0ミクロン、菌の配列は単独或は2連のV字状を呈するものが多い。幼稚な分岐(Rudimentary branching)を示す細胞も認められる。(肉汁寒天30°,24時間)グラム陽性
運動性はない
胞子を形成しない
培養性質:(30°,7日)

○肉汁寒天平板培養

円形、平滑、中高、全縁、鈍い光沢あり、不透明、バター状、黄色

○肉汁寒天斜面培養

良好な生育、糸状、不透明、黄色

○肉汁培養

表面に生育しない。沈渣を形成して生育する。

○肉汁ゼラチン穿刺培養

液化しない

○ミルク

変化しない

○ビーシービー・ミルク

不変ないし僅かにアルカリ性にする

生理的性質:

○硝酸塩を還元しない(30°,7日)

○インドールを生成しない(30°,7日)

○澱粉を分解する(30°,7日)

○アセチルメチルカルビノールを生成しない(30°,7日)

○メチルレッド反応陽性(30°,7日)

○硫化水素を僅かに生成する(システイン添加培地)(30°,15日)

○ペプトン培地においてグルコース、サツカロースより酸を生成する(ガス発生は認められない)(30°,10日)

○ペプトン培地においてグリセロール、キシロース、ラクトース、澱粉より酸を生成しない(30°,10日)

○ヒュー・ライフソンの方法でグルコース、サツカロースより好気的にも、嫌気的にも酸を生成する(ガス発生は何れの場合も認められない)(30°,10日)

○ヒュー・ライフソンの方法でグリセロール、キシロース、ラクトース、澱粉より好気的にも嫌気的にも酸を生成しない(30°,10日)

○硝酸呼吸をしない

○カタラーゼ陽性

○好気性

○生育適温:25°~33℃

5 ○分離源:土壌

上記菌学的諸性質をバーチス・マニュアル・

オブ・デタミネイティブバクテリオロジー第7版

(1957年)を用いて既知の菌種と対比するに

本菌はコリネバクテリウム属に属すると考えられ

10 るが本菌と合致する菌種はない。しかるに米国特

許第3117915に記載のコリネバクテリウム・

アセトアシドフィラムATCC13890に近似

するが、コリネバクテリウム・アセトアシドフィ

ラムATCC13890がグルタミン酸を生産す

15 るが本菌株は実質的にグルタミン酸を生産しない

ので同一菌種とするには疑問がある。そして本菌

株は1例のみであるので新菌種とするには問題が

あると考え、コリネバクテリウム・エスピーとし

た。

20 本発明によつて5'-イノシン酸を製造する際の

原料イノシンは化学合成によるもの、生物体から

の抽出分解等によるもの、あるいは発酵法により

生産されるもののいずれでも良い。その際上記諸

方法によつて得られる結晶イノシンは勿論のこと、

25 粗結晶、イノシン含有液、あるいはイノシン発酵

液そのもの等、いずれでも十分使用出来る。例え

ば発酵生産によりイノシンを得た場合には、イノ

シン含有培養液を適当な方法により殺菌するか、

又は発酵液から菌体その他の不溶物を適当な方法

30 で除去した後、無機磷酸塩、マグネシウム塩、及

びグルコース等を補添した後、コリネバクテリウ

ム属に属し、イノシンと無機磷酸塩より5'-イノ

シン酸を生産する能力を有する細菌を接種し、好

気的に培養することにより、これら細菌の生育に

35 伴つて、培養液中に存在していたイノシンの磷酸

化が起り、著量の5'-イノシン酸に変換して蓄積

させることが出来る。

本発明によつて5'-イノシン酸を製造する際の

磷酸供与体としては磷酸又は無機磷酸塩で良い。

例えば第一磷酸カリ、第二磷酸カリ、磷酸アンモ

ニウム、磷酸ソーダ、磷酸カルシウム、磷酸マグ

ネシウム等の使用が可能である。使用菌株により

異なるが、高収率で5'-イノシン酸を得るには一

般に磷酸塩濃度が高い方が良く、例えば第一磷酸

5

カリに例をとれば、1~2%の添加が好ましい。

これら使用菌株の培養には通常の栄養培地が用いられる。即ち炭素源としてはグルコース、フラクトース、マントース等の単糖類、マルトース、シクロロース等の二糖類、リボース、キシロース等のペントース類、あるいは澱粉の酸、あるいは酵素分解液、醋酸、グルコン酸等の有機酸類、糖蜜等が使用される。又適当に菌を選べば炭化水素も利用出来る。窒素源としては塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、尿素、各種有機酸のアンモニウム塩、アンモニア水、アンモニア・ガス等の無機窒素源、或いはアミノ酸などの有機窒素源が利用される。その他菌体の生育に必要なカリウム、マグネシウム、磷酸、鉄、マンガン、硫黄などの化合物の添加が必要である。このうちイノシンから5'-イノシン酸の高収率生成には、特に磷酸塩とマグネシウム塩の濃度が重要である。前述の如く、磷酸塩は、菌体の生育に必要な量を遙かに越えた高濃度の添加が望ましく、又マグネシウム塩も同様に菌体生育必要量をはるかに越えた高濃度が好ましく、硫酸マグネシウム7水塩に例をとれば、0.6%以上の添加で、5'-イノシン酸を高収率で得ることが出来る。これらの他に菌体生育に必要な又は促進的な化合物、すなわちビタミン類、アミノ酸類、これらを含有する諸種天然物、例えば酵母エキス、コーンステイブリカー、ペプトン、味液、マルトエキス等の添加が有利な場合もある。特にコリネバクテリウムエスピー・AJ 1562に属する細菌を用いる場合は、ビタミン類としてイノシトール、ニコチン酸及びビオチンの存在がイノシンからの5'-イノシン酸への変換に有利である。

上記の諸物質を含有する培地にイノシンを添加し、コリネバクテリウム属に属し、イノシンと無機磷酸塩より5'-イノシン酸を生産する能力を有する細菌を接種し、培養すると、菌体の増殖と共にイノシンの磷酸化が起り、5'-イノシン酸が生成蓄積する。

5'-イノシン酸の高収量生成には好氣的培養条件が良く、通常の振盪培養、通気攪拌培養等が用いられる。培養中のpH値は5'-イノシン酸の生成に大きな影響を有するが、pH 5~9でイノシンの磷酸化は進行する。特に5~7のpH範囲で良い収率が得られる。

6

培養温度は25~40℃の範囲が良く、特に30~35℃の範囲で高収率が得られる。培養時間は菌株や培養条件により異なるが、大体3~4日である。

又イノシン源としてイノシン発酵終了液そのものを用いる場合には適当な炭素源、磷酸塩、マグネシウム塩等は補添する必要があるが、いわゆる生育促進因子の如きものは、イノシン発酵液中にかなり含有されているのが普通であるから、これらは特に補添しなくても良い場合もある。

イノシンは、最初から培地に添加せずに、菌体培養の途中、あるいは培養終了後に分割してあるいは全量を一時に添加しても良い。

本発明によつて生成蓄積した5'-イノシン酸を単離する方法としては、既知のイオン交換樹脂法、溶剤抽出法、沈殿法等の単独又は組合せが使用される。

実施例 1

グルコース10%、磷酸第一カリ2%、硫酸マグネシウム・7水塩0.8%、第二磷酸アンモニウム0.5%、リジン70mg%、アルギニン45mg%、ヒスチジン20mg%、メチオニン15mg%、チロシン15mg%、フェニルアラニン30mg%、グルタミン酸120mg%、プロリン30mg%、グリシン40mg%、イソロイシン40mg%、ロイシン60mg%、アラニン65mg%（いずれもL-アミノ酸）ビオチン40 μ g/L、ニコチン酸1000 μ g/L、イノシトール5 μ g/L、鉄イオン2ppm、イノシン0.6%、炭酸カルシウム（別殺菌）5%の培地を調製し、苛性カリにてpH 6.5に調整する。培地20mlを500ml容肩付き振盪フラスコに分注し、110℃で5分間オートクレーブ殺菌する。

酵母エキス1%、ペプトン1%、塩化ナトリウム0.5%、グルコース0.2%、寒天2%、pH7.0の組成から成るスラント上で31.5℃、24時間予め培養したコリネバクテリウム・エスピー・AJ 1562株（工発研菌第47号）を培地20ml当りスラント1/4本の割合で接種し、31.5℃で往復振盪培養した。菌体の増殖と共にイノシンが5'-イノシン酸に交換しはじめ、70時間の培養後イノシンはほぼ100% 5'-イノシン酸に変り、5'-イノシン酸1.18g/dlが蓄積した。培養液中にはイノシンと5'-イノシン酸以外の副生

7

プリン系化合物は認められなかつた。

実施例 2

グルコース 8%, 第一磷酸カリ 0.1%, 硫酸マグネシウム (7 水塩) 0.04%, 塩化アンモニウム 1.5%, 鉄イオン 2 ppm, マンガンイオン 2 ppm, 塩化カリウム 0.15%, イソロイシン、ロイシン、メチオニン、グリシン、バリン、スレオニン、フェニルアラニン及びリジン各々 40 mg ずつ (いずれも L-アミノ酸)、L-ヒスチジン 20 mg、アデニン 17.5 mg、炭酸カルシウム (別殺菌) 102.5% の培地を調製し、苛性カリにて pH 7.2 に調整した後、その 20 ml を 500 ml 容肩付フラスコに分注し、110℃、5 分間オートクレーブ殺菌した。あらかじめ酵母エキス 1%, ペプトン 1%, 塩化ナトリウム 0.5%, 寒天 2%, pH 7.0 のスラント上で 31.5℃、24 時間培養したバチルス・ズブチリス № 1346 (ATCC № 13952) を上記培地 20 ml に一白金耳接種し、31.5℃で培養 (往復振盪) してイノシン酸の生成を行なつた。72 時間後の分析で培養液中に 0.88 g/dl のイノシン酸が生成していた。

このイノシン酸発酵液を集め、一部はそのまま 110℃、5 分間オートクレーブ殺菌し、一部は遠心分離により菌体、炭酸カルシウムその他の不溶物を除去し、透明なイノシン酸含有発酵上澄液を得た。これら殺菌発酵液、又は菌体除去上澄液についてそのまゝか、又は水で 1/2 に希釈し、各々にグルコース 8%, 磷酸第二アンモニウム 0.5%, 硫酸マグネシウム (7 水塩) 0.8%, 第一磷酸カリ 2.0%, ビオチン 20 μ /L、ニコチン酸 1000 μ /L、イノシトール 5 μ /L 及び実施例 1 と同じ 12 種の L-アミノ酸を各 40 mg になるように補添し、pH を苛性カリで 6.5 に調整後、

8

これら培地 20 ml を 500 ml 容肩付振盪フラスコに分注し、110℃、5 分間オートクレーブ殺菌した。しかる後にコリネバクテリウム・エスビ-・AJ1562 株 (工発研菌寄第 47 号) を実施例 1 と同様に前培養の後、接種し、31.5℃で往復振盪培養した。培養 80 時間後、着量の 5'-イノシン酸の蓄積が認められた。結果を第 1 表にまとめる。

第 1 表

培 地	始発イノシン濃度	生成 5'-イノシン酸
④遠心上澄液	0.88 g/dl	1.45 g/dl
⑤ " 1/2 希釈	0.44	0.86
⑥殺菌発酵液	0.88	0.81
⑦ " 1/2 希釈	0.44	0.71

なお、イノシン酸発酵液中にはヒポキサンチンは検出されず、又殺菌液あるいは遠心上澄液中にもヒポキサンチンは検出されなかつた。さらに磷酸化の培養中には未反応のイノシンと生成 5'-イノシン酸のみ認められ、ヒポキサンチン等は検出されなかつた。

⑤特許請求の範囲

1 コリネバクテリウム属に属し、イノシンと無機リン酸塩より 5'-イノシン酸を生産する能力を有する細菌を、イノシン及び無機リン酸塩を含有する反応系に作用させ、生成した 5'-イノシン酸を採取することを特徴とする微生物による 5'-イノシン酸の製造法。

⑥引用文献

特 公 昭 45-37078